

【特許請求の範囲】

【請求項1】 植物細胞又は植物組織を熱処理及び遠心処理することに伴う、アグロバクテリウム属細胞を介して行われる植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法。

【請求項2】 植物細胞又は植物組織を熱処理及び遠心処理した後、遺伝子導入処理を行う請求項1記載の方法。

【請求項3】 熱処理が3℃～60℃の温度範囲で行われる請求項1又は2記載の方法。

【請求項4】 熱処理が35℃～55℃の温度範囲で行われる請求項3記載の方法。

【請求項5】 熱処理が37℃～52℃の温度範囲で行われる請求項4記載の方法。

【請求項6】 熱処理が5秒間～24時間の範囲で行われる請求項1ないし5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】 37℃～52℃の温度下で1分間～24時間熱処理を行う請求項1又は2記載の方法。

【請求項8】 遠心処理が100G～25万Gの遠心加速度の範囲で行われる請求項1ないし7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項9】 遠心処理が500G～20万の遠心加速度の範囲で行われる請求項8記載の方法。

【請求項10】 遠心処理が1000G～15万Gの遠心加速度範囲で行われる請求項9記載の方法。

【請求項11】 遠心処理が1秒間～4時間の範囲で行われる請求項1ないし10のいずれか1項に記載の方法。

【請求項12】 用いる植物細胞又は植物組織が被子植物由来である請求項1ないし11のいずれか1項に記載の方法。

【請求項13】 用いる植物細胞又は植物組織が单子葉植物由来である請求項12記載の方法。

【請求項14】 用いる植物細胞又は植物組織がイネ科植物由来である請求項13記載の方法。

【請求項15】 用いる植物細胞又は植物組織がイネ、トウモロコシ又はシバである請求項14記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】
【発明の属する技術分野】 本発明は、植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 アグロバクテリウムによる形質転換法は、一般的に、効率が低い、導入される遺伝子のコピー数が少ない、T-DNAという特定の領域を断片化させることなく導入できる、短期間の培養により形質転換を得ることができるといった特徴を有する。このため、さまざまな植物種で最も有用な形質転換の手段として広く用いられている。

【0003】 このように、アグロバクテリウム法は非常に

(19) 日本国特許庁 (JP) (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-342253

(P2000-342253A)

(43) 公開日 平成12年12月12日(2000.12.12)

(51) Int. Cl.⁷ C12N 15/09

F1

識別記号

チコード(参考)

A 4B024

審査請求 未請求 請求項の数15 OL (全16項)

(21) 出願番号 特願平11-158028

(71) 出願人 00004569

日本たばこ産業株式会社

東京都港区虎ノ門二丁目2番1号

(22) 出願日 平成11年6月4日(1999.6.4)

(72) 発明者 徳江井 祐弘

静岡県静岡市駿河区東原700番地 日本たばこ産業株式会社遺伝子育種研究所内

(72) 発明者 笠岡 啓介

静岡県静岡市駿河区東原700番地 日本たばこ産業株式会社遺伝子育種研究所内

(74) 代理人 100088546

弁理士 谷川 英次郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法

(57) 【要約】

【課題】 従来のアグロバクテリウム法による遺伝子導入方法よりも高い効率で組織を付与することなく簡単に遺伝子導入を行うことができる。植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法を提供すること。

【解決手段】 植物細胞又は植物組織を熱処理及び遠心処理することに伴う、アグロバクテリウム属細胞を介して行われる植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法を提供した。

に優れた植物の形質転換方法であるが、形質転換の成否ならびに効率は、植物種、遺伝子型ならびに用いる植物組織に依存して大きく異なるのが実状である (Hervey et al., 1998(参考文献(36))). すなわち、形質転換に成功しない植物種があるほか、ごく一部の品種のみ形質転換が可能な植物種も多い。また、利用可能な組織が限定されており大抵の材料を取り扱うことができない植物種もある。遺伝子組換えにより実用的な品種を作出するには、多数の形質転換植物を作出した上で、目的とする形質を持った系統を選抜する必要がある。しかしながら、この目的に即し多数の形質転換体を容易に得ることができる作物の種は、現状では一部に限定されている。したがって、このような問題を解決することができる改良手法の開発が強く望まれている。

【0004】 アグロバクテリウムを介する形質転換方法自体は、植物種により供与材料や培養に用いる培地の組成などを異にするものの、材料となる組織にアグロバクテリウムの懸濁液を接触させ、共存培養の後に形質転換細胞の選抜を行い、形質転換植物を作出するという操作ではほぼ共通している。材料となる植物組織には対しては、通常、必要に応じ滅菌処理を行うがそれ以外に特別な処理を施すことなくアグロバクテリウムの感染が行われる (Rogers et al., 1988(参考文献(37)), Visser 1991(参考文献(41)), McCormick 1991(参考文献(31)), Lindey et al., 1991(参考文献(30))). 従って、形質転換系の改良は、アグロバクテリウムの菌系、ベクター構成、培地組成、選抜マーカー遺伝子やプロモーターの選別、供試組織の種類などを中心に研究が行われてきた。

【0005】 これに対し、アグロバクテリウムを接種する前の植物組織を、遺伝子導入が生じやすい生理的狀態に変換するという考えに基づき研究は、ほとんど行われていない。何らかの箇度な処理により、そのような生理的狀態に変換することができればいへん利用価値が高くなり、遺伝子導入効率の向上に加え、従来困難であった植物種や遺伝子型の形質転換を可能にする顕著な効果も期待される。これまでの植物組織への前処理に関する研究例としては、パーチクルガン(Birney et al., 1992(参考文献(40)))および超音波(Pirick H.N. et al., 1997(参考文献(40)))処理が上げられる。どちらも物理的に組織を付与することによってアグロバクテリウムの感染を促進し、感染対象となる植物細胞を増加させることを目的としている。しかしながら、これは従来より広く行われているリフティス法(Larsen et al., 1985(参考文献(19)))を模倣させたものに過ぎず、新規な考えに基づき処理法ではない。なお、効果の程度や使用性は明らかでなく、一般的な手法として用いられていないのが現状である。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】 従って、本発明の目的は、従来のアグロバクテリウム法による遺伝子導入方法

よりも高い効率で組織を付与することなく簡便に遺伝子導入を行うことができる。植物細胞への遺伝子導入効率を向上させる方法を提供することである。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、従来研究の結果、アグロバクテリウム属細菌を用いた遺伝子導入方法において、遺伝子導入に供する植物細胞又は植物組織を熱処理及び遠心処理することにより、遺伝子導入効率を有意に向上させることができることを見出し本発明を完成した。

【0008】すなわち、本発明は、植物細胞又は植物組織を熱処理及び遠心処理することを行う。アグロバクテリウム属細菌を介して行われる植物細胞への遺伝子導入効率を向上させる方法を提供する。

【0009】

【発明の実施の形態】本発明の方法では、アグロバクテリウム属細菌を介した遺伝子導入方法において、遺伝子導入する植物細胞又は植物組織を熱処理及び遠心処理することを行う。植物細胞又は植物組織は、熱処理及び遠心処理した後、常温及び通常の重力下でアグロバクテリウム属細菌と接触させてもよいし、熱処理及び遠心処理した後にアグロバクテリウム属細菌と接触させてもよい。また、アグロバクテリウム属細菌と接触させる前に熱処理及び遠心処理を行う場合、これらの処理は同時に実行してもよいし、いずれかの処理を先行行った後にもう一方の処理を行ってもよい。

【0010】熱処理条件は、用いる植物の種類や熱処理する細胞又は組織の量等に応じて適宜選択されるが、通常、30℃～80℃、好ましくは33℃～55℃、さらに好ましくは37℃～52℃程度の温度範囲で行われる。また、熱処理の時間は、熱処理温度、用いる植物の種類及び熱処理する細胞又は組織の種類等に応じて適宜選択されるが、通常5秒間～24時間程度である。なお、熱処理の時間は、熱処理温度が高い場合には短くても遺伝子導入効率を有意に向上させることができる。例えば、熱処理温度が60℃の場合には5秒間程度の熱処理時間でも遺伝子導入効率を有意に向上させることができる場合がある。一方、熱処理温度が34℃程度の低温の場合には、数十分間の熱処理により遺伝子導入効率を有意に向上させることができる。特に好ましい熱処理条件は、37℃～52℃で1分間～24時間程度の場合が多いが、その植物細胞又は植物組織に24時間程度の熱処理条件は、ルーチンな実験により容易に設定することができる。また、植物細胞又は植物組織を55℃以上の温度で長時間にわたって熱処理すると、植物細胞がダメージを受け、形質転換効率が低下する場合があるため、熱処理温度が55℃以上の場合には、熱処理時間を短くし、例えば3分間以下、好ましくは1分間以下程度に設定して植物細胞がダメージを受けないようにすることが好ましい。

【0011】遠心処理条件は、用いる植物の種類等に応じて適宜選択されるが、通常、100G～250万G、好ましくは500G～200万G、さらに好ましくは1000G～150万G程度の遠心加速度範囲で行われる。また、遠心処理の時間は、遠心加速度及び用いる植物の種類等に応じて適宜選択されるが、通常1秒間以上行うことが好ましい。なお、遠心時間の上限は特にないが、通常、10分間程度を目的を達成することができる。なお、遠心処理時間は、遠心加速度が大きい場合には極めて短い時間、例えば1秒以下でも遺伝子導入効率を有意に向上させることができる。一方、遠心加速度が小さい場合には、遠心処理を長く行うことにより遺伝子導入効率を有意に向上させることができる。特に好ましい遠心処理条件は、500G～200万G、特に1000G～150000Gで1秒間～2時間程度の場合が多いが、その植物細胞又は植物組織ととの適切な遠心処理条件は、ルーチンな実験により容易に設定することができる。

【0012】本発明の方法は、アグロバクテリウム属細菌と接触させる植物細胞又は植物組織として熱処理及び遠心処理したものをを用いる。又は熱処理、遠心処理を行わないがアグロバクテリウム属細菌と接触させることを特徴とするものであり、アグロバクテリウム属細菌を用いた遺伝子導入あるいは形質転換方法自体としては、周知の方法をそのまま適用することができる。

【0013】アグロバクテリウム属細菌を用いた植物への遺伝子導入あるいは形質転換方法自体は、この分野において周知であり、広く用いられている。

【0014】土壌細菌アグロバクテリウム (Agrobacterium tumefaciens) が多くの双子葉植物に根癌腫瘍 (crown gall disease) を引き起こすことは古くから知られており、1970年代には、Tiプラスミドが病原性に関与すること、さらにTiプラスミドの一部であるT-DNAが植物ゲノムに組み込まれることが発見された。その後このT-DNAは癌腫の誘発に必要なホモロゲン (サイトカイニンとオーキシン) の合成に関与する遺伝子が存在し、癌腫遺伝子でありながら植物中で発現することが明らかにされた。T-DNAの切り出しと植物への伝達にはTiプラスミド上のゲリレンス領域 (vir領域) に存在する遺伝子群が必要であり、またT-DNAが切り出されるためにはT-DNAの両端に存在するターゲター配列が必要である。他のアグロバクテリウム属細菌であるAgrobacterium mirzae nosもTiプラスミドによる同様のシステムを有している (図3及び図4)。

【0015】アグロバクテリウムの感染によってT-DNAが植物ゲノムに組み込まれるので、T-DNAに所望の遺伝子を導入すると、その遺伝子も植物ゲノムに組み込まれることが期待される。しかしながら、Tiプラスミドは190kb以上と巨大であるため、標準的な遺伝子工学手法で

難であった。そのため、T-DNA上に外来遺伝子を導入するたための方法が開発された。

【0016】また、腫瘍性TiプラスミドのT-DNAからホモモノ合成遺伝子が除去されたTiプラスミド型の菌株 (disarmed strains) であるLBA4404 (Heckema et al., 1983 (参考文献(14)))、C58C1 (Gallagher) (Zambryski et al., 1983 (参考文献(44))), G371115 (Fralley et al., 1985 (参考文献(10))) などが作成された (図3)。これらを用いることにより、所望の遺伝子をアグロバクテリウムのTiプラスミドのT-DNA中に、あるいは所望の遺伝子を有するT-DNAをアグロバクテリウムを導入する種別の方法が開発された。このうちの一つは、遺伝子操作が容易で所望の遺伝子の導入が可能であり、大腸菌で複製ができる中間ベクターを、アグロバクテリウムのTiプラスミドのT-DNA領域中に、三系交雑法 (triparental mating) (Ohta et al., 1980 (参考文献(9))) を介して相互に交換により導入する方法であり、中間ベクター法と呼ばれる (Fralley et al., 1985 (参考文献(10))); Fralley et al., 1983 (参考文献(11)); Zambryski et al., 1983 (参考文献(44)); 特開昭59-140885号 (EP16718))。もう一つは、バイナリーベクター (binary vector) 法とよばれるもので (図3)、T-DNAの植物への組み込み及びvir領域が必要であるが、機能するために同じプラスミド上に存在しないという結果 (Heckema et al., 1983 (参考文献(14))) に基づいていて、このvir領域にはvirA, virB, virC, virD, virE及びvirGが存在し、(植物アグロバクテリウム) 事典 (エンタプライズ株式会社発行 (1989))、vir領域とはこのvirA, virB, virC, virD, virE及びvirGの全てを含むものをいう。したがって、バイナリーベクターは、T-DNAをアグロバクテリウムと大腸菌の両方で複製可能な小さなプラスミドに組み込んだものであり、これをTiプラスミドに組み込んだものをアグロバクテリウムに導入して用いる。アグロバクテリウムへのバイナリーベクターの導入には、エレクトロポレーション法や三系交雑法などの方法により行うことができる。バイナリーベクターには、pBIN19 (Bevan, 1984 (参考文献(5))), pB1121 (Jefferson, 1987 (参考文献(21))), pCAMB2 (An et al., 1988 (参考文献(2)))、特開昭60-70080号 (EP20516))、1988 (参考文献(2)) などがあり、これらをもとに数多くの新たなバイナリーベクターが構築され、形質転換に用いられている。また、Tiプラスミドのシステムにおいて、同様のベクターが構築され形質転換に用いられている。

【0017】アグロバクテリウムA281 (Nelson et al., 1975 (参考文献(42))) は、強病原性 (super-virulent) の菌株であり、その宿主範囲は広く、形質転換効率も他の菌株より高い (Hood et al., 1987 (参考文献(15))); Kimari, 1989 (参考文献(23))。この特性は、A281が有するTiプラスミドのpTi80542によるものである (Hood et al., 1984 (参考文献(18))); Jin et al., 1987 (参考文献

(22)); Komari et al., 1986 (参考文献(26))。【0018】pTi80542を用いて、これまで2つの新しいシステムが開発されている。一つはpTi80542のTiプラスミド型のTiプラスミドを有する菌株pHUK01 (Hood et al., 1986 (参考文献(17))) およびpHUK05 (Hood et al., 1993 (参考文献(16))) を用いたものであり、これらを上記のバイナリーベクターシステムと適用することにより、形質転換能力の高いシステムとして種々の植物の形質転換に利用されている。もう一つは、スーパーバイナリーベクター (super-binary vector) (Niet et al., 1994 (参考文献(13))); Ishida et al., 1996 (参考文献(20)); Komari et al., 1999 (参考文献(28)); W994/0097号、W95/05722号) システムである (図4)。このシステムは、vir領域 (virA, virB, virC, virD, virE及びvirG) (以下、これらをそれぞれ「vir領域」ということもある。) を持つTiプラスミド型のTiプラスミドおよびT-DNAを有するプラスミドからなることから、バイナリーベクターシステムの一つである。しかしながら、T-DNAを有する側のプラスミド、即ちバイナリーベクターにvir領域のうち、少なくとも一つのvir領域を事実的に取除いたvir領域の断片 (このうち好ましくはvirB及びvirEを含む断片) を組み込んだ (Komari, 1990a (参考文献(24))) スーパーバイナリーベクターを用いる点で異なる。なお、スーパーバイナリーベクターを有するアグロバクテリウムに、所望の遺伝子を組み込んだT-DNA領域を導入するには、三系交雑法を介した相互感染が容易な手法として利用できる (Komari et al., 1996 (参考文献(27))); Li et al., 1996 (参考文献(29)); Sai et al., 1992 (参考文献(38))。【0019】本発明の方法においては、前記とならないアグロバクテリウム属細菌としては、特に限定されないが、Agrobacterium tumefaciens (例えば上述のAgrobacterium tumefaciens LBA4404 (Heckema et al., 1983 (参考文献(14))) およびpHUK01 (Hood et al., 1986 (参考文献(17))) を好ましく用いることができる。

【0020】本発明の方法によれば、アグロバクテリウム属細菌における病原性 (vir) 領域の遺伝子群の発現に基づく遺伝子導入系であれば、特に限定されることなく有意な効果を得ることができる。したがって、上述の中間ベクター、バイナリーベクター、強病原性のバイナリーベクター、スーパーバイナリーベクターなど、いずれのベクターシステムに対しても用いることができ、本発明による効果を得ることができる。これらのベクター類を改変した異なるベクターシステムを用いる場合におい

でも同様である（例えば、アロバクテリウム属細菌のT₁領域の一部または全部を切り出し附加的にプラスミド中に組み込む、*vir*領域の一部または全部を切り出して新たなプラスミドの一部としてアロバクテリウム属細菌に導入するなど）。また、当然にあらはるが本発明の方法によれば、野生型のアロバクテリウム属細菌においても、植物のT₁領域の導入効率を高め、事実上感染効率を向上することができると考えられる。

境に左右されやすく形質転換に好適な未熟胚材料を常時得ることは容易ではないが、組み合わせた処理を施すことにより安定した高い形質転換効率を維持することが可能である。Hiei et al. (1994(参考文献(13)))は、形質転換能力の高いベクターであるスーパーバイナリーベクターがイネの形質転換効率を向上させることを示した。また、Albenita et al., 1996(参考文献(1))によれば、スーパーバイナリーベクターのLB4404(pG2J1m)を用いた試験においては、形質転換効率を維持している。本研究における組み合わせ処理法は、通常のバイナリーベクターを用いた場合においても、スーパーバイナリーベクター

＊ターに匹敵するか、それ以上の遺伝子導入効率を得ることができ、また、スーパーバイナリーベクターと組み合わせ処理法を併用することにより、より一層効率を向上させることが可能である。さらに、組み合わせ処理法を用いることにより、これまで全く形質転換体を得ることができなかった品種においても形質転換体を得ることができると推察される。

【0042】

【表1】表1 熱・遠心処理と未熟胚処理におけるQ5遺伝子の一過性発現 (品種：朝の光)

| 処理温度 (処理時間) | 遠心速度 (処理時間) | 検数 | 未熟胚 | | | | | | |
|----------------|----------------|----|-------------------------|-----|------|-------|-------|-------|--------|
| | | | 胚盤表面における Q5 発現陽性の割合 (%) | | | | | | |
| | | | 0 | 0-1 | 1-10 | 10-20 | 20-50 | 50-80 | 80-100 |
| - | - | 20 | 3 | 6 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 46°C (5分) | - | 20 | 1 | 6 | 7 | 4 | 2 | 0 | 0 |
| - | 20,000 (30分) | 20 | 0 | 1 | 4 | 7 | 7 | 1 | 0 |
| 46°C (5分) | 20,000 (30分) | 20 | 0 | 0 | 0 | 2 | 9 | 8 | 1 |

供試菌株系：LB4404(pG2J1m)、共存培養期間：5日 ※【表2】表2 熱・遠心処理と未熟胚処理におけるQ5遺伝子の一過性発現 (品種：朝の光)

| 処理温度 (処理時間) | 遠心速度 (処理時間) | 検数 | 未熟胚 | | | | | | |
|----------------|----------------|----|-------------------------|-----|------|-------|-------|-------|--------|
| | | | 胚盤表面における Q5 発現陽性の割合 (%) | | | | | | |
| | | | 0 | 0-1 | 1-10 | 10-20 | 20-50 | 50-80 | 80-100 |
| - | - | 20 | 3 | 13 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 46°C (5分) | - | 20 | 0 | 0 | 10 | 7 | 3 | 0 | 0 |
| - | 20,000 (30分) | 20 | 0 | 0 | 3 | 9 | 8 | 0 | 0 |
| 46°C (5分) | 20,000 (30分) | 20 | 0 | 0 | 0 | 3 | 14 | 3 | 0 |

供試菌株系：LB4404(pG2J1m)、共存培養期間：6日 ※【表3】表3 未熟胚への熱・遠心処理と形質転換カルの選抜効率 (品種：朝の光)

| 処理温度 (処理時間) | 遠心速度 (処理時間) | 供試菌株 胚切片数 (A) | 形質転換 効率 (%) | 形質転換 効率 (%) |
|----------------|----------------|---------------------|----------------|----------------|
| - | - | 50 | 6 | 12.0 |
| 46°C (5分) | - | 51 | 15 | 29.4 |
| - | 20,000 (30分) | 51 | 29 | 50.9 |
| 46°C (5分) | 20,000 (30分) | 46 | 29 | 63.0 |

供試菌株系：LB4404(pG2J1m)、共存培養期間：5日、H ※【表4】表4 未熟胚への熱・遠心処理と形質転換カルの選抜効率 (品種：朝の光)

| 処理温度 (処理時間) | 遠心速度 (処理時間) | 供試菌株 胚切片数 (A) | 形質転換 効率 (%) | 形質転換 効率 (%) |
|----------------|----------------|---------------------|----------------|----------------|
| - | - | 60 | 7 | 11.7 |
| 46°C (5分) | - | 60 | 9 | 15.0 |
| - | 20,000 (1分) | 60 | 46 | 80.0 |
| - | 20,000 (30分) | 60 | 46 | 80.0 |
| 46°C (5分) | 20,000 (1分) | 60 | 51 | 83.0 |
| 46°C (5分) | 20,000 (30分) | 60 | 51 | 85.0 |

供試菌株系：LB4404(pG2J1m)、共存培養期間：6日、H ※【表5】表5 未熟胚への熱・遠心処理と形質転換カルの選抜効率 (品種：朝の光)

| 処理温度 (処理時間) | 遠心速度 (処理時間) | 供試菌株 胚切片数 (A) | 形質転換 効率 (%) | 形質転換 効率 (%) |
|----------------|----------------|---------------------|----------------|----------------|
| - | - | 62 | 18 | 28.0 |
| 46°C (5分) | - | 64 | 32 | 52.5 |
| - | 20,000 (30分) | 60 | 39 | 65.0 |
| 46°C (5分) | 20,000 (30分) | 60 | 41 | 68.3 |

供試菌株系：LB4404(pG2J1m)、共存培養期間：6日、PP ※【表6】表6 未熟胚への熱・遠心処理と形質転換カルの選抜効率 (品種：朝の光)

供試菌株系：LB4404(pG2J1m)、共存培養期間：6日、PP ※【表7】表7 未熟胚への熱・遠心処理と形質転換カルの選抜効率 (品種：朝の光)

供試菌株系：LB4404(pG2J1m)、共存培養期間：6日、PP ※【表8】表8 未熟胚への熱・遠心処理と形質転換カルの選抜効率 (品種：朝の光)

【0048】共存培養後の未熟胚をファスフィノシリシ (PPF) 及び10 μ M AgNO₃ を含む培地で培養し、形質転換細胞の選抜を行った。選抜培地上で増殖したカルスに PPF を含む再分化培地に遷移し、形質転換細胞の再分化を行った。再分化した植物の葉の一部を切り取り、実施例1と同様にX-quickによりQUS遺伝子の発現を調査した。なお、上記の培地および培養法は、Ishida, Y. et al., 1996(参考文献(20))に記載の方法に従った。

【0049】本発明を行った未熟胚にLB44404(GS8131)を接種したときのQUS遺伝子のトランジェントな発現の結果を表6に示す。無処置の対照を含め接種した全2つの未熟胚でQUS遺伝子の発現が認められた。しかし、その発現部位は対照に比べ熱処理及び熱・遠心の組合せ処理した場合に強く見られた。特に組合せ処理した場合には、未熟胚の胚盤表面の広い部位でQUS遺伝子の発現を示すものが最も多く見られた。

【0050】LB44404(GS8131)を接種した未熟胚での形質転換結果を表7に示す。熱処理していない対照の未熟胚からは、10.7%の効率で形質転換植物が得られた。これに対し、20 Kc、4℃、30分間の遠心処理を行った未熟胚では、形質転換効率は13.3%で、無処置の対照に比べ、効率が向上した。熱処理を行った未熟胚での形質転換効率は20%で、無処置の対照に比べて向上した。さらに、熱・遠心の組合せ処理を行った場合、形質転換効率は無処置の対照の29.6%であった。

※

A4404(GS8131)を導入した。

| 処理 | 未熟胚数 | PPF 耐性 | | | |
|------|------|-----------|-----------|----------|----------|
| | | カルス (%) | カルス (N) | 植物 (N) | 植物 (%) |
| 無処置 | 20 | 9 (45.0) | 9 (45.0) | 3 (15.0) | 3 (15.0) |
| 熱 | 30 | 18 (60.0) | 18 (60.0) | 6 (20.0) | 6 (20.0) |
| 遠心 | 30 | 14 (46.7) | 14 (46.7) | 4 (13.3) | 4 (13.3) |
| 熱・遠心 | 27 | 23 (85.2) | 23 (85.2) | 8 (29.6) | 8 (29.6) |

カルス数、植物数はいずれもクローニングを含まない。

【0054】実施例3

クレーピングベントグラス (*Agrostis palustris* cv. P encross, 智印種苗 (株)) の完熟種子を滅菌後、45% 飽和、MSビタミナ、4 μ M/1 dicamba、0.5 μ M/16A、0.7 μ M/1プロリン、0.5 μ M/1 MES、20 μ M/1シロイロ、3 μ M/1 α -naphthalene (3.5) を含む培地 (T2) に播種し、25℃、暗黒下で培養した。発芽したカルスを同組成の培地で増殖させ、エンブジョエニクナカルスを増殖した。得られたエンブジョエニクナカルスをT2カルスから *Agrostis* を除いた組成の液体培地 (T2L) に移し、25℃、暗黒下で培養することにより、胚盤表面増殖を得た。継代後3-4日目の胚盤増殖細胞をT2L培地を含む2 ml のチューブに入れ、同液体培地で一回洗浄した。新たに液体培地 2 ml を加えた。45℃のウォーターバスにチューブを5分間浸漬した。培地を除き、新たな同液体培地を加えた後、5,000 rpm、4℃、10分間遠心処理

細胞でのQUS遺伝子の発現を表8に示す。対照の細胞は、わずかに細胞増殖がQUSの発現を示したのみであった。これに対し、熱・遠心処理した場合、約20%の細胞増殖がQUS遺伝子の発現を示した。また、QUS遺伝子の発現部位も対照の細胞増殖に比べ、熱・遠心処理した細胞増殖ではその部位は大きかった。

【0055】今までに報告されているシバの形質転換は、パーティクルガン (Zhong et al. 1993(参考文献(45)), Hartman et al. 1994(参考文献(33)), Xiao, L. et al. 1997(参考文献(43))) やエレクトロポレーション (Asano Y., 1994(参考文献(33)), Asano Y. et al. 1998(参考文献(44))) による直接導入法によるもので、アグロバクテリウムによる形質転換の成功例はみられない。本実施例でもみられたように、従来法による遺伝子導入の効率の低さが、アグロバクテリウム法によるシバの形質転換を困難にしている原因であれば、高効率で遺伝子導入のなされる本発明の熱・遠心の組合せ処理により、形質転換植物の得られる可能性が示された。

【0057】

【表8】表8 シバ胚盤培養細胞への遺伝子導入効率に

及ぼす熱・遠心処理の効果

| 処理 | 細胞数 | QUS+ | |
|------|-----|--------|--------|
| | | 細胞 (%) | 細胞 (N) |
| 熱・遠心 | 70 | 23 | 29.1 |
| 対照 | 101 | 1 | 1.0 |

共存培養後、2週間後にQUS遺伝子の発現を調査

【0058】

【発明の効果】本発明により、従来のアグロバクテリウム法による遺伝子導入方法よりも高い効率で、組織を付着することなく簡単に遺伝子導入を行うことができる。植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法が提供された。本発明の方法は、種子集積物に対しても双子葉植物に対しても適用可能である。また、シバのように、従来のアグロバクテリウム法では形質転換することができなかった植物も、本発明の方法により形質転換が可能になった。

【0059】参考文献

(1) Aldemita RR, Hodges TK (1996) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of japonica and indica rice varieties. *Planta* 199: 612-617
(2) An, G., Evert, P.R., Mitra, A. and Ha, S.B. (1988) *Binary vectors*. In Gelvin, S.B. and Schilperoort, R.A. (eds.), *Plant Molecular Biology Manual A* 3. Kluwer Academic Press, Dordrecht, pp. 1-19.
(3) Asano, Y., Uspaki, M. (1994) Transgenic plants of *Agrostis alba* obtained by electroporation-mediated direct gene transfer into protoplasts. *Plant Cell Reports* 13:243-246.

(4) Asano, Y., Ito, Y., Fukami, M., Sugiyama, K., Fujie, A. (1998) Herbicide-resistant transgenic creeping bentgrass plants obtained by electroporation using an altered buffer. *Plant Cell Reports* 17:963-967.
(5) Bevan, M. (1984) *Binary Agrobacterium vectors for plant transformation*. *Nucleic Acids Res.* 12, 8711-8721.
(6) Bidney, D., Scelone, C., Hartlich, J., Burrus, M., Sims, L., and Huffman G. (1992) Microprojectile bombardment of plant tissues increases transformation frequency by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol. Biol.* 18, 301-313.
(7) Chilton, M.D., Currier, T.C., Farrand, S.K., Bendish, A.J., Gordon, M.P., Wester, J.W. (1974) *Agrobacterium tumefaciens* DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71:3672-3676
(8) Chu, C. C., (1978) *Proc. Symp. Plant Tissue Culture*, Science Press Peking, pp.43-50
(9) Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D. and Helinski, D.R. (1980) Broadhost range DNA cloning system for Gram-negative bacteria: Construction of gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 7347-7351.
(10) Fraley, R.T., Rogers, S.G., Horsch, R.B., Eichholtz, D.A. and Flick, J.S. (1983) The SEV system: a new disarmed Ti plasmid vector for plant transformation. *Bio/technology*, 3, 629-635.
(11) Fraley, R.T., Rogers, S.G., Horsch, R.B., Sanders, P.R., Flick, J.S., Adams, S.P., Blitner, M., Brand, L.A., Fink, C.L., Fry, J.S., Galluppi, G.R., Goldberg, S.B., Hoffman, N.L. and Woo, S.C. (1983) Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80, 4803-4807.
(12) Hartman, C.L., Lee, L., Day, P.R., Turner, M. E. (1994) Herbicide resistant turfgrass (*Agrostis palustris* Huds.) by biolistic transformation. *Biotechnology* 12:919-923.
(13) Ito, Y., Ohta, S., Konari, T. and Kumashiro, T. (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant Journal*, 6, 271-282.
(14) Ikebama, A., Hirsch, P.R., Iwakawa, P.J.J., and Schilperoort, R.A. (1983) A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nucl. Acids Res.* 11:179-180.
(15) Hood, E.E., Fraley, R.T. and Chilton, M.D.

ant Tissue Culture Manual 85:1-9. Kluwer Academic Publishers.

(42) Watson, B., Currier, T.C., Gordon, M.P., Chilton, M.-D. and Nester, E.W. (1975) Plasmid required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. J. Bacteriol., 123, 255-264.

(43) Xiao, L., He, S.-B. (1997) Efficient selection and regeneration of creeping bentgrass transformants following particle bombardment. Plant Cell Reports 16:874-878.

(44) Zambryski, P., Joes, H., Genetello, C., Lemans, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. EMBO J., 2, 2143-2150.

(45) Zhong, H., Bolyard, M.G., Srinivasan, C., Sticklen, M.B. (1993) Transgenic plants of turgrass (*Abraxos palustris* Huds.) from microprojectile bombardment of embryogenic callus. Plant Cell Reports 13:1-6.

(46) Zhong, H., Bolyard, M.G., Srinivasan, C., Sticklen, M.B. (1993) Transgenic plants of turgrass (*Abraxos palustris* Huds.) from microprojectile bombardment of embryogenic callus. Plant Cell Reports 13:1-6.

(47) Zhong, H., Bolyard, M.G., Srinivasan, C., Sticklen, M.B. (1993) Transgenic plants of turgrass (*Abraxos palustris* Huds.) from microprojectile bombardment of embryogenic callus. Plant Cell Reports 13:1-6.

(48) Zhong, H., Bolyard, M.G., Srinivasan, C., Sticklen, M.B. (1993) Transgenic plants of turgrass (*Abraxos palustris* Huds.) from microprojectile bombardment of embryogenic callus. Plant Cell Reports 13:1-6.

(49) Zhong, H., Bolyard, M.G., Srinivasan, C., Sticklen, M.B. (1993) Transgenic plants of turgrass (*Abraxos palustris* Huds.) from microprojectile bombardment of embryogenic callus. Plant Cell Reports 13:1-6.

(50) Zhong, H., Bolyard, M.G., Srinivasan, C., Sticklen, M.B. (1993) Transgenic plants of turgrass (*Abraxos palustris* Huds.) from microprojectile bombardment of embryogenic callus. Plant Cell Reports 13:1-6.

(51) Zhong, H., Bolyard, M.G., Srinivasan, C., Sticklen, M.B. (1993) Transgenic plants of turgrass (*Abraxos palustris* Huds.) from microprojectile bombardment of embryogenic callus. Plant Cell Reports 13:1-6.

(52) Zhong, H., Bolyard, M.G., Srinivasan, C., Sticklen, M.B. (1993) Transgenic plants of turgrass (*Abraxos palustris* Huds.) from microprojectile bombardment of embryogenic callus. Plant Cell Reports 13:1-6.

(53) Zhong, H., Bolyard, M.G., Srinivasan, C., Sticklen, M.B. (1993) Transgenic plants of turgrass (*Abraxos palustris* Huds.) from microprojectile bombardment of embryogenic callus. Plant Cell Reports 13:1-6.

(54) Zhong, H., Bolyard, M.G., Srinivasan, C., Sticklen, M.B. (1993) Transgenic plants of turgrass (*Abraxos palustris* Huds.) from microprojectile bombardment of embryogenic callus. Plant Cell Reports 13:1-6.

(55) Zhong, H., Bolyard, M.G., Srinivasan, C., Sticklen, M.B. (1993) Transgenic plants of turgrass (*Abraxos palustris* Huds.) from microprojectile bombardment of embryogenic callus. Plant Cell Reports 13:1-6.

(56) Zhong, H., Bolyard, M.G., Srinivasan, C., Sticklen, M.B. (1993) Transgenic plants of turgrass (*Abraxos palustris* Huds.) from microprojectile bombardment of embryogenic callus. Plant Cell Reports 13:1-6.

(57) Zhong, H., Bolyard, M.G., Srinivasan, C., Sticklen, M.B. (1993) Transgenic plants of turgrass (*Abraxos palustris* Huds.) from microprojectile bombardment of embryogenic callus. Plant Cell Reports 13:1-6.

(58) Zhong, H., Bolyard, M.G., Srinivasan, C., Sticklen, M.B. (1993) Transgenic plants of turgrass (*Abraxos palustris* Huds.) from microprojectile bombardment of embryogenic callus. Plant Cell Reports 13:1-6.

(59) Zhong, H., Bolyard, M.G., Srinivasan, C., Sticklen, M.B. (1993) Transgenic plants of turgrass (*Abraxos palustris* Huds.) from microprojectile bombardment of embryogenic callus. Plant Cell Reports 13:1-6.

(60) Zhong, H., Bolyard, M.G., Srinivasan, C., Sticklen, M.B. (1993) Transgenic plants of turgrass (*Abraxos palustris* Huds.) from microprojectile bombardment of embryogenic callus. Plant Cell Reports 13:1-6.

(61) Zhong, H., Bolyard, M.G., Srinivasan, C., Sticklen, M.B. (1993) Transgenic plants of turgrass (*Abraxos palustris* Huds.) from microprojectile bombardment of embryogenic callus. Plant Cell Reports 13:1-6.

(62) Zhong, H., Bolyard, M.G., Srinivasan, C., Sticklen, M.B. (1993) Transgenic plants of turgrass (*Abraxos palustris* Huds.) from microprojectile bombardment of embryogenic callus. Plant Cell Reports 13:1-6.

(63) Zhong, H., Bolyard, M.G., Srinivasan, C., Sticklen, M.B. (1993) Transgenic plants of turgrass (*Abraxos palustris* Huds.) from microprojectile bombardment of embryogenic callus. Plant Cell Reports 13:1-6.

(64) Zhong, H., Bolyard, M.G., Srinivasan, C., Sticklen, M.B. (1993) Transgenic plants of turgrass (*Abraxos palustris* Huds.) from microprojectile bombardment of embryogenic callus. Plant Cell Reports 13:1-6.

(65) Zhong, H., Bolyard, M.G., Srinivasan, C., Sticklen, M.B. (1993) Transgenic plants of turgrass (*Abraxos palustris* Huds.) from microprojectile bombardment of embryogenic callus. Plant Cell Reports 13:1-6.

(66) Zhong, H., Bolyard, M.G., Srinivasan, C., Sticklen, M.B. (1993) Transgenic plants of turgrass (*Abraxos palustris* Huds.) from microprojectile bombardment of embryogenic callus. Plant Cell Reports 13:1-6.

(67) Zhong, H., Bolyard, M.G., Srinivasan, C., Sticklen, M.B. (1993) Transgenic plants of turgrass (*Abraxos palustris* Huds.) from microprojectile bombardment of embryogenic callus. Plant Cell Reports 13:1-6.

(68) Zhong, H., Bolyard, M.G., Srinivasan, C., Sticklen, M.B. (1993) Transgenic plants of turgrass (*Abraxos palustris* Huds.) from microprojectile bombardment of embryogenic callus. Plant Cell Reports 13:1-6.

(69) Zhong, H., Bolyard, M.G., Srinivasan, C., Sticklen, M.B. (1993) Transgenic plants of turgrass (*Abraxos palustris* Huds.) from microprojectile bombardment of embryogenic callus. Plant Cell Reports 13:1-6.

(1987) Virulence of *Agrobacterium tumefaciens* strains in A281 on legumes. Plant Physiol., 83, 529-534.

(1988) Hood, E.E., Gelvin, S.B., Melchers, L.S. and Hoekema, A. (1983) Novel *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. Transgenic Res., 2, 208-218.

(1989) Hood, E.E., Helmer, G.L., Fraley, R.T. and Chilton, R.D. (1986) The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. J. Bacteriol., 168, 1291-1301.

(1990) Hood, E.E., Jon, G., Kayes, L., Kramer, J., Fraley, R.T. and Chilton, R.D. (1984) Restriction endonuclease map of pTiBo542, a potential Ti-plasmid vector for genetic engineering of plants. Bio/Technology, 2, 702-709.

(1991) Horsch, R.B., Fry, J.E., Hofmann, N.L., Eichholtz, D., Rogers, S.G. and Fraley, R.T. (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. Science, 227, 1229-1231.

(1992) Ishida, Y., Saito, H., Ohta, S., Hiei, Y., Komari, T. and Kumashiro, T. (1996) High efficiency transformation of maize (Zea mays L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Nature Biotechnology, 14, 745-750.

(1993) Jefferson, R.A. (1987) Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. Plant Molecular Biology, 5, 387-405.

(1994) Jin, S., Komari, T., Gordon, M.P. and Nester, E.W. (1987) Genes responsible for the supervirulence phenotype of *Agrobacterium tumefaciens* A281. J. Bacteriol., 169, 4417-4425.

(1995) Komari, T. (1989) Transformation of callus cultures of nine plant species mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Reports, 14, 223-229.

(1996) Komari, T. (1990a) Genetic characterization of double-flowered tobacco plant obtained in a transformation experiment. Theor. Appl. Genet., 80, 107-117.

(1996) Komari, T. (1990b) Transformation of cultured cells of *Chenopodium quinoa* by binary vectors that carry a fragment of DNA from the virulence region of pTiBo542. Plant Cell Reports, 9, 303-306.

(1996) Komari, T., Hiei, Y., Saito, Y., Murai, N. and Kumashiro, T. (1996) Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant

diated by *Agrobacterium tumefaciens* and sequestration of transformants free from selection markers. Plant J., 10, 165-174.

(1996) Komari, T. and Kubo, T. (1999) Methods of Genetic Transformation: *Agrobacterium tumefaciens*. In Vasil, I.K. (ed.) Molecular improvement of cereal crops. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 43-82.

(1997) Li, H.-Q., Sautter, C., Potrykus, I. and Poon, C. (1996) Genetic transformation of *Carthamus tinctorius* L. (safflower) by *Agrobacterium tumefaciens*. Nature Biotechnology, 14, 736-740.

(1998) Lindsey, K., Gallois, P. and Eady, C. (1991) Regeneration and transformation of sugarbeet by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Tissue Culture Manual 86:1-9. Kluwer Academic Publishers.

(1999) Murashige, T. and Skoog, F. (1962) Physiol. Plant 15:473-497.

(2000) Ohta, S., Mita, S., Hattori, T., Nakanuma, K. (1990) Construction and expression in tobacco of a *glucuronidase* (GUS) reporter gene containing a non-intron within the coding sequence. Plant Cell Physiol., 31: 805-813.

(2001) Potrykus, I., Hams, C. T. and Lutz, H. (1979) Callus formation from cell culture protoplasts of corn (*Zea mays* L.). Theor. Appl. Genet., 54:209-214.

(2002) Potrykus, I., Bilang, R., Futterer, J., Sautter, C. and Schrott, M. (1998) Agricultural biotechnology, Marcel Dekker Inc. pp. 119-159.

(2003) Rogers, S.G., Horsch, R.B. and Fraley, R.T. (1988) Gene transfer in plants: Production of transformed plants using Ti plasmid vectors. Method for Plant Molecular Biology, Oxford Academic Press Inc. pp. 423-436.

(2004) Saito, Y., Komari, T., Masuta, C., Hayashi, Y., Kumashiro, T. and Takanami, Y. (1992) Cucumber mosaic virus-tolerant transgenic tomato plants expressing a satellite RNA. Theor. Appl. Genet., 83, 679-683.

(2005) Toriyama, K. and Hinata, K. (1985) Plant Sci. 41:179-183

(2006) Trick, H.M. and Finer, J.J. (1997) SAAT: sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation. Transgenic Research 6:329-336.

(2007) Visser, R.G.F. (1991) Regeneration and transformation of potato by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant

* ステムを示す模式図である。
(符号の説明)

DL アグロバクテリウム属細菌のT-DNAの左ボーター配列

RR アグロバクテリウム属細菌のT-DNAの右ボーター配列

TC テトラサイクリン抵抗性遺伝子

SP スペクチノマイシン抵抗性遺伝子

IG イントロントGUS遺伝子

10 HPT ハイグロマイシン抵抗性遺伝子

NPT カナマイシン抵抗性遺伝子

K 制限酵素KpnI部位

H 制限酵素HindIII部位

Amp^r アンプシリン耐性遺伝子

BAR bar遺伝子

ODS, cos ラムダファージのcos部位

ORI, ori ColE1の複製開始点

P35S CaMV 35Sプロモーター

Thos ノバリン合成酵素遺伝子のターミネーター

20 virB *Agrobacterium tumefaciens* A281に含まれるTiプラスミドpTiBo542のヴィレンス領域中のvirB遺伝子

virC *Agrobacterium tumefaciens* A281に含まれるTiプラスミドpTiBo542のヴィレンス領域中のvirC遺伝子

virD *Agrobacterium tumefaciens* A281に含まれるTiプラスミドpTiBo542のヴィレンス領域中のvirD遺伝子

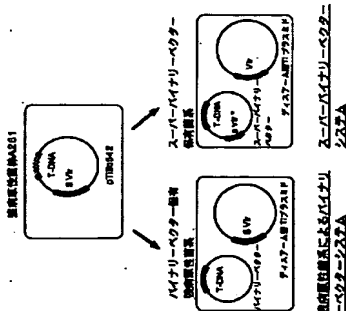
virE *Agrobacterium tumefaciens* A281に含まれるTiプラスミドpTiBo542のヴィレンス領域中のvirE遺伝子

virF アグロバクテリウム属細菌のTiプラスミドの全vir領域

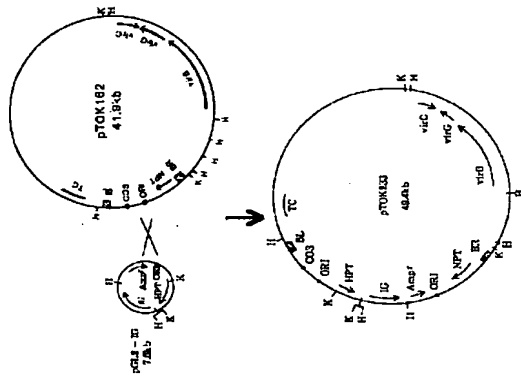
S vir 強弱性アグロバクテリウム属細菌のTiプラスミドpTiBo542の全vir領域

30 S vir* TiプラスミドpTiBo542のvir領域の一部を含む断片

【図4】



【❏】



【图2】

